8 月 August
2020, 63(8): 1010 - 1015
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: // www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2020.08.011

# 丝光绿蝇蛹壳颜色变化及其对死后间隔时间推断的意义

王 贺[1], 唐 晁[2], 齐莉莉[1,*], 董春楠[1], 宋兆昱[2], 任晓鹏[2]

(1. 河北医科大学病原生物学教研室, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学检验技术学院, 石家庄 050000)

**摘要:**【目的】研究不同恒温下丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 蛹期蛹壳颜色变化,并利用提取的蛹壳 RGB 值绘制标准色板,为法医学中死后间隔时间(postmortem interval, PMI)的推断提供科学依据。【方法】在 16, 20, 24, 28 和 32℃ 恒温下分别饲养丝光绿蝇待其发育至蛹期,选取 10 头蛹为观察样本,每隔 12 h 定期观察蛹壳的颜色变化,拍照并利用图像分析软件提取蛹期各观察时间点蛹壳颜色的 RGB 值,再将分析计算后的 RGB 值还原为标准色板,并采用 R 软件对蛹发育时间与蛹壳颜色 RGB 值中的 R 值的关系进行多元回归分析和拟合。【结果】不同恒温下,丝光绿蝇蛹壳颜色随发育时间均呈现出不均衡的加深趋势,尤其在化蛹初期和临近羽化时变化明显。根据各发育时间的标准 RGB 值可制作出对应不同恒温的 5 个丝光绿蝇蛹壳颜色标准色板。【结论】在案发现场,可将检获到的蝇蛹与本研究得到的相近温度下的蛹壳颜色标准色板进行比色鉴定,初步估算蛹期,为死后间隔时间的推断提供科学依据。

**关键词:** 丝光绿蝇; 温度; 蛹壳颜色; 标准色板; RGB 值; 死后间隔时间

**中图分类号:** Q964 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)08-1010-06

# Puparium color variation of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) and its significance for the estimation of the postmortem interval

WANG He[1], TANG Chao[2], QI Li-Li[1,*], DONG Chun-Nan[1], SONG Zhao-Yu[2], REN Xiao-Peng[2]
(1. Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Inspection Technology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract:**【Aim】This study aims to examine the changing trend of puparium color of a common necrophagous fly (*Lucilia sericata*) under different constant temperatures and to prepare the standard color plates based on the RGB values of puparium, so as to provide a scientific support for the estimation of the postmortem interval (PMI) in forensic medicine.【Methods】Ten pupae of *L. sericata* were sampled at 12 h intervals from prepupa to emergence under different constant temperatures (16℃, 20℃, 24℃, 28℃ and 32℃). The variation of puparium color at all the observed time points in the pupal stage of *L. sericata* was observed and photographed. The corresponding RGB values of puparium color were collected and analyzed by digital image processing system to prepare the standard color plates. Multivariate regression analysis was employed for fitting the relationship between the developmental time of pupa and the R value of the RGB values of puparium color by R software.【Results】The puparium color of *L. sericata* gradually deepened with the developmental time under different constant temperatures, and obvious changes were observed at the beginning and final time of the pupal stage. Based on the RGB

基金项目: 河北省省卫计委科研基金项目(20180691); 大学生创新性实验河北医科大学校级立项(USIP2018090); 河北省高等学校科学技术研究青年基金项目(QN2016213)
作者简介: 王贺, 女, 1980 年 10 月生, 河北辛集人, 硕士, 讲师, 研究方向为法医昆虫学, E-mail: wanghe1007@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qilili1983@126.com
收稿日期 Received: 2020-01-03; 接受日期 Accepted: 2020-03-25

values at different developmental time, five standard color plates of *L. sericata* puparium were prepared corresponding to different constant temperatures. 【Conclusion】At the crime scene, the standard color plates of puparium obtained in this study can be used to preliminarily estimate the pupal stage through visual comparison as an auxiliary method. Based on this estimation, the PMI can be deduced.

**Key words**: *Lucilia sericata*; temperature; puparium color; standard color plates; RGB value; PMI

死后间隔时间(postmortem interval, PMI)一直是法医学研究的热点之一,而法医昆虫学的发展为PMI的推断开辟了新途径(胡萃, 2000)。尸食性蝇类是人类尸体腐败过程中,最早出现在尸体上的昆虫之一,它们可以在尸体上产卵并孵化成幼虫最后化蛹,这一过程中,尸体的很多信息会"记录"在它们体内,通过研究蝇的各种指标找到这些信息从而为侦破案件提供依据正是法医昆虫学家的主要任务(李学博等, 2013)。目前,关于尸食性蝇类的研究多集中在了幼虫期,而蝇蛹往往是案件现场尸体周围发现率最高的虫态之一(马孟云等, 2016),因此,蛹期的研究至关重要。

蝇蛹的蛹壳颜色自化蛹后呈现规律性变化,可作为蝇蛹日龄的良好指标(Greenberg, 1985),因此,利用蛹壳颜色变化推测死亡时间将是一种简便易行的办法。国内关于案发现场尸食性蝇类蛹期的发育形态研究不少(王江峰等, 2002),而蛹壳颜色变化的研究不多。本研究旨在探寻一种将蛹壳颜色变化具体量化从而更加准确地反映蛹期发育时间的方法,为PMI的推断提供新思路。丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 是最常见的尸食性蝇类之一,也是石家庄市优势蝇种,对其蛹期的深入研究可为石家庄市蝇类研究和在法医学上的应用积累资料。

# 1　材料与方法

## 1.1　标本采集与饲养

在位于石家庄长安区的河北医科大学校园内以大鼠内脏诱捕成蝇,带回实验室,按照《中国蝇类检索表》(范滋德, 1997)系统进行鉴定分类,选取丝光绿蝇放入养蝇笼内,置于MGC-300B型智能光照培养箱(温度28℃,相对湿度50%～60%,光周期为12L∶12D)内饲以清水、奶粉与糖混合物(1∶1, m/m),并两天更换一次,以保持干净新鲜。饲养至第3代作为实验虫源。

用猪肉诱蝇产卵分别置于16, 20, 24, 28和32℃的培养箱(MGC-300B型)内饲养幼虫直至其化蛹,随机选取10头蛹移至盛有2/3细沙的90 mm灭菌培养皿中,两蛹之间间隔≥15 mm,各蛹朝向角度一致,保持细沙湿度。

## 1.2　提取蛹壳颜色数据

自化蛹起每间隔12 h,取出蝇蛹进行观察拍照。拍照环境为:室内自然光线,距工作台上方垂直500 mm高度处放置LED补光灯。用软毛刷轻扫蛹体后用镊子轻轻逐个夹取蝇蛹至体视显微镜(OLYMPUS-SZ61)的载物台上,依次拍照,分别留取不同恒温下的蛹壳颜色图片。拍照完的蝇蛹再次放回培养皿中,置回原培养箱,待12 h后重复上述步骤直至羽化。将图片导入图像分析系统中,做图片预处理后,在窗口下选择"颜色"选择框,利用"颜色取样器"(颜色取样器选项栏中的取样大小设定为5×5,即一次读取5×5像素区域的平均值)随机在蛹壳上选取50个像素点,读取颜色数据,分别记录颜色板中的RGB值,取各自均值作为该恒温下每间隔12 h的丝光绿蝇蛹壳颜色的标准RGB值。

## 1.3　制作色板和回归分析

将不同恒温下蛹壳颜色随发育时间变化的标准RGB值导入图像分析软件中,使用"颜色板"工具,制作与发育时间一一对应的蛹壳颜色标准色块,并将色块保存至各温度下的文件夹。在Word文档中打开各色块文件,调整至相同大小,按发育时间排列,制作各恒温下的蛹壳颜色标准色板。采用R软件对蛹发育时间与蛹壳颜色RGB值中的R值的关系进行多元回归分析和拟合。

## 1.4　数据分析

本研究测得数据的处理使用Excel软件和R软件(ver. 3.6.3),图片处理使用Adobe Photoshop cc2017和Motic Image Advanced 3.2软件。

# 2　结果

## 2.1　丝光绿蝇蛹壳颜色变化规律

在不同恒温条件下,丝光绿蝇的蛹壳颜色随发育时间总体呈逐渐加深趋势,但此变化不均匀,开始为浅白黄色或淡黄色,很快变为黄褐色至红褐色,红褐色蛹壳占据蛹期大部分时间,直到临近羽化,由于透过蛹壳可看到内部蛹体组织,此时的蛹已全身布

满黑褐色鬃毛，所以蛹壳颜色变至最深呈黑褐色。可见，蛹壳颜色在化蛹初期和临近羽化时变化较大，在一定的温度范围内，温度越高，蛹的发育历期越短，蛹壳颜色变化趋势也越快（图 1）。

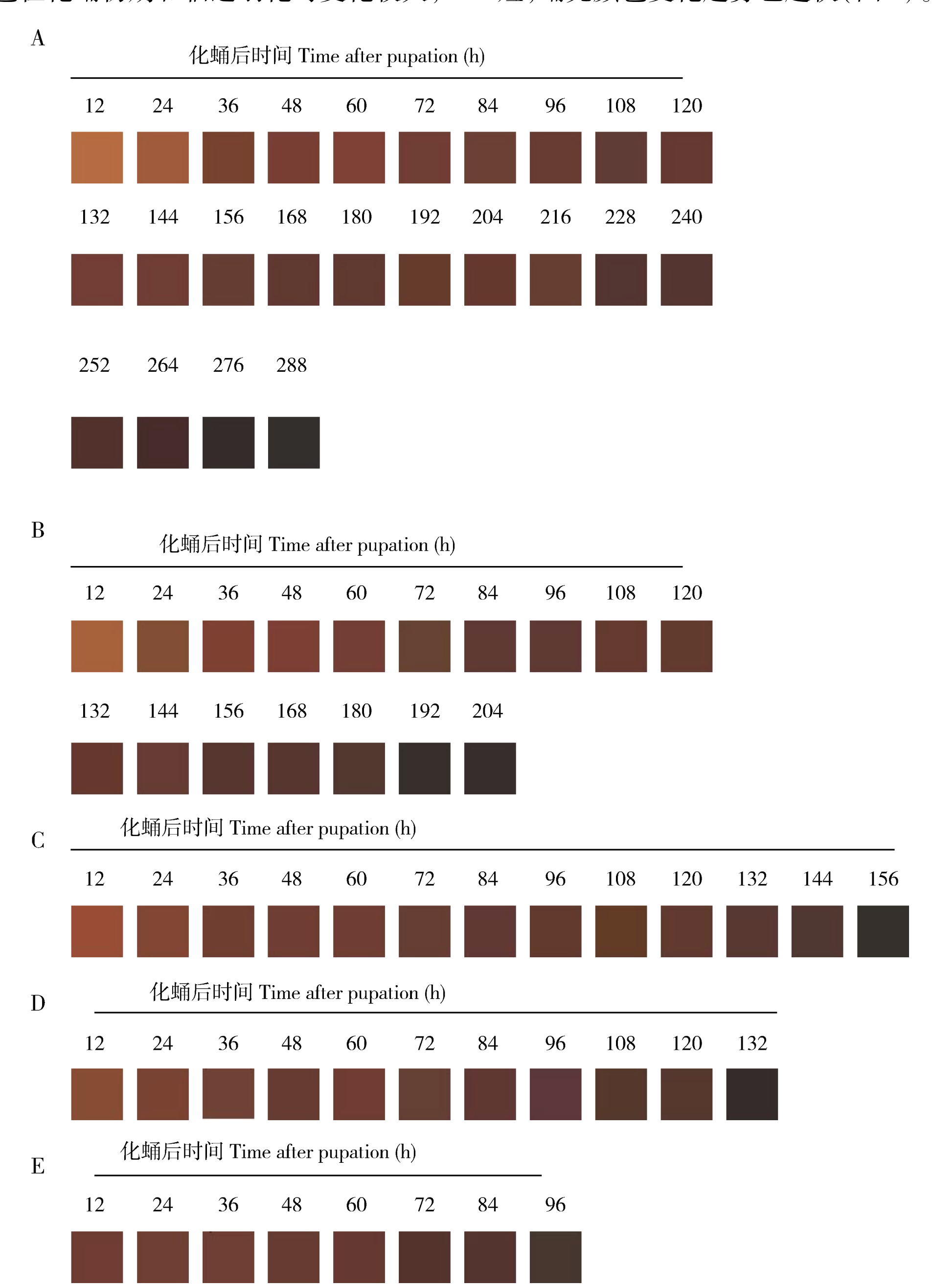



图 1 不同恒温下丝光绿蝇蛹壳颜色标准色板

Fig. 1 Standard color plates of *Lucilia sericata* puparium color at different constant temperatures

A: 16℃; B: 20℃; C: 24℃; D: 28℃; E: 32℃.

## 2.2 蛹壳颜色 RGB 值的变化

各恒温下蛹壳颜色的 RGB 值（表 1）随发育时间均呈下降趋势，尤其在化蛹初期及临近羽化时更明显；RGB 值的变化幅度也有差异，其中 R 变化最明显，是蛹壳颜色变化的主导，而 B 变化最平缓，大致呈减低趋势。随温度升高，蛹壳 RGB 值的变化历期越短。采用 R 软件进行多元回归分析和拟合，结果 RGB 值中以 R 值与时间的拟合度最佳，建立的多项式回归方程为：$x = \beta_0 + \beta_1 y + \beta_2 y^2 + \beta_3 y^3$，其中 $y$ 为发育时间（h），$x$ 即该发育时间对应的蛹壳颜色 RGB 值中的 R 值。各温度下三次函数拟合效果均佳，经方差分析均有统计学意义（$P < 0.01$）（表 2）。

## 2.3 蛹壳颜色的标准色板

根据 RGB 值（表 1），利用图像处理软件得到不

**表 1　不同恒温下丝光绿蝇蛹壳颜色的 RGB 值**

**Table 1　RGB values of *Lucilia sericata* puparium color at different constant temperatures**

| 化蛹后时间(h) Time after pupation | 温度 Temperature (℃) | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 | | | 20 | | | 24 | | | 28 | | | 32 | | |
| | R | G | B | R | G | B | R | G | B | R | G | B | R | G | B |
| 12 | 190 | 110 | 53 | 176 | 96 | 47 | 160 | 76 | 45 | 145 | 75 | 45 | 120 | 59 | 48 |
| 24 | 170 | 90 | 48 | 140 | 78 | 46 | 140 | 70 | 47 | 130 | 66 | 46 | 120 | 62 | 48 |
| 36 | 127 | 65 | 41 | 136 | 64 | 46 | 120 | 61 | 45 | 120 | 65 | 49 | 119 | 61 | 48 |
| 48 | 129 | 63 | 49 | 134 | 62 | 48 | 120 | 61 | 46 | 110 | 59 | 46 | 112 | 59 | 47 |
| 60 | 136 | 63 | 49 | 123 | 62 | 49 | 120 | 61 | 48 | 119 | 59 | 48 | 110 | 56 | 47 |
| 72 | 121 | 60 | 50 | 109 | 67 | 47 | 109 | 61 | 48 | 106 | 62 | 48 | 90 | 51 | 43 |
| 84 | 115 | 64 | 49 | 103 | 57 | 48 | 105 | 56 | 48 | 104 | 55 | 48 | 90 | 52 | 45 |
| 96 | 112 | 60 | 48 | 104 | 57 | 48 | 106 | 57 | 43 | 99 | 55 | 56 | 75 | 55 | 45 |
| 108 | 105 | 60 | 51 | 108 | 57 | 44 | 107 | 58 | 35 | 92 | 56 | 42 | | | |
| 120 | 109 | 57 | 46 | 107 | 58 | 44 | 105 | 57 | 46 | 92 | 55 | 43 | | | |
| 132 | 123 | 61 | 49 | 109 | 56 | 43 | 96 | 56 | 47 | 56 | 43 | 43 | | | |
| 144 | 120 | 60 | 48 | 110 | 59 | 48 | 86 | 56 | 48 | | | | | | |
| 156 | 108 | 63 | 49 | 95 | 54 | 46 | 55 | 48 | 45 | | | | | | |
| 168 | 104 | 58 | 47 | 89 | 55 | 47 | | | | | | | | | |
| 180 | 105 | 57 | 50 | 86 | 56 | 46 | | | | | | | | | |
| 192 | 110 | 59 | 43 | 56 | 47 | 45 | | | | | | | | | |
| 204 | 109 | 57 | 45 | 57 | 46 | 45 | | | | | | | | | |
| 216 | 110 | 62 | 46 | | | | | | | | | | | | |
| 228 | 90 | 52 | 47 | | | | | | | | | | | | |
| 240 | 91 | 54 | 46 | | | | | | | | | | | | |
| 252 | 88 | 51 | 43 | | | | | | | | | | | | |
| 264 | 76 | 45 | 42 | | | | | | | | | | | | |
| 276 | 56 | 45 | 45 | | | | | | | | | | | | |
| 288 | 52 | 48 | 45 | | | | | | | | | | | | |

**表 2　不同恒温下丝光绿蝇蛹壳颜色 RGB 值中的 R 值与发育时间的拟合方程**

**Table 2　Cubic curve fit of the R value of RGB values of *Lucilia sericata* puparium color and the developmental time of pupa at different constant temperatures**

| 温度(℃) Temperature | 拟合曲线 Cubic curve fit | 决定系数 $R^2$ | *P* 值 *P*-value |
|---|---|---|---|
| 16 | $x = 201.0487 - 1.8733y + 0.0125y^2 - 2.744e-05y^3$ | 0.9333 | <0.01 |
| 20 | $x = 195.7353 - 2.3137y + 0.0206y^2 - 6.238e-05y^3$ | 0.9539 | <0.01 |
| 24 | $x = 189.4406 - 2.8172y + 0.0334y^2 - 1.329e-04y^3$ | 0.974 | <0.01 |
| 28 | $x = 169.0758 - 2.3173y + 0.0316y^2 - 1.532e-04y^3$ | 0.9523 | <0.01 |
| 32 | $x = 114.2143 + 0.6505y - 0.0171y^2 + 6.430e-05y^3$ | 0.9652 | <0.01 |

$y$：发育时间 Developmental time (h)；$x$：该发育时间对应的蛹壳颜色 RGB 值中的 R 值 R value of the RGB value of puparium color corresponding to this developmental time.

同恒温下丝光绿蝇蛹壳颜色的标准色板(图 1)。

由 RGB 值和绘制的标准色板可得出：在不同恒温、其余生存条件相同的条件下，丝光绿蝇蛹壳的标准色板由淡黄色渐至红褐色直至黑褐色，这一变化是连续但不均匀的，红褐色色板占据蛹期大部分时间；温度越高，色板数量越少，表明蛹发育历期越短，温度越低，色板数量多，发育历期越长。RGB 值随时间延长数值越低，导致蛹壳色板越暗。

## 3　讨论

近年来，法医昆虫学发展迅速，国内外很多学者对尸食性蝇类的蛹期形态发育进行过研究，Greenberg 曾提出根据蛹壳颜色变化的过程，建立一个颜色与化蛹后时间一一对应的色板，再以待检蛹壳与标准色板对比，即可得出蝇蛹日龄的想法

(Greenberg, 1995),但未见后续。国内 Ma 等(2015)对大头金蝇 *Chrysomya megacephala*、巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* 等蝇蛹的发育形态做了详细研究,积累了宝贵资料,同时也观察到化蛹后蛹壳颜色由淡黄色至红褐色,之后逐渐加深的现象,并提出根据蛹壳的颜色可进一步更准确地推断死亡时间。笔者一直致力于尸食性蝇蛹蛹期的发育形态学研究,对蛹壳颜色也做了些初探性试验研究,发现记录蛹壳的颜色变化可得到有价值的时间证据(王贺, 2007)。本实验为进一步研究将蛹壳的颜色变化标准化的方法,通过试验方法的改进更准确地捕捉蛹壳颜色变化的信息数据,以增强此法实际应用的可靠性。

首先,蛹壳标本的选取方法。通常的蝇蛹发育学研究都是按一定的时间间隔定期留取标本,这种方法存在蛹发育不同步的问题,样本量足够大的情况下,可以忽略。但以往的实验,我们发现留取大量标本很难实现,尤其在发育历期较长的温度下。此次实验我们改变采集标本方法,即开始化蛹时选取 10 头发育基本同步的蛹,对其定期持续观察,即以活蛹为标本采集颜色信息。此法需要注意每次取蛹动作轻柔,以保证其存活至羽化。以后的实验可以增加标本量,使获得的 RGB 值更准确。

其次,蛹壳 RGB 值的影响因素。本实验利用图像分析软件对不同发育阶段的蛹壳随机选取像素点,提取各个像素点的 RGB 值,分别取均值作为该温度该发育时间的蛹壳颜色的标准 RGB 值,像素点的选择区域由最初的胸背局部范围扩大到全蛹,像素点数量也增多至 50 个,蛹体颜色是一个成千上万 RGB 混合而成的复合颜色,像素点的样本量越大,色板才能越真实地反映蛹壳颜色。通常情况下, RGB 各有 256 级亮度,用数字表示为从 0, 1, 2, …, 255,因此 RGB 组成有千万种,用其表示色彩是相当灵敏的,我们对实验条件严格要求,以尽量减少采集图像、读取 RGB 值过程中的偏差,保证标准色卡的使用可靠性:(1)拍照环境的光照强度保持恒定。我们采用工作台设置补光灯的方法,补光灯参数为 20 ~ 30 W,色温为 3 200 ~ 5 000 K,显色指数 Ra≥95,距桌面垂直高度 500 mm 左右,以尽量减少环境光线变化对图片色彩的影响。(2)应用图像分析软件采集图片和读取 RGB 值时,应先进行白平衡校对,并将所有图片的色阶、对比度、色调等以参照卡[图像软件中 RGB 配色表分量均为 190 的灰色(Grey)色卡]为标准进行校正。我们建议,标准色板可用于初筛,将待检蛹与色板进行目视比色,粗略估算蛹期,要精确推断日龄,可按上述试验方法提取待检蛹壳的 RGB 值,参考各温度下 R 值的曲线拟合方程,可获得发育时间,同时可结合蛹内形态发育或其他生理生化指标(郑娜等, 2016)。近几年很多学者不断尝试,如利用影像诊断技术 CT 等来观察蛹内部发育以推断蛹期(Hall, 2017),为蛹期发育研究开辟了新思路。

本实验观察到红褐色蛹壳存在时间较长,我们曾竭力试图将红褐色阶段再分,但由于此阶段颜色变化视觉差甚小,肉眼难以区别,这与 Greenberg (1995)的蛹壳从白色到红褐色的转变可提供前 10 个多小时的颜色标志的结论相似。可见,利用蛹壳颜色推断蛹期的方法在化蛹初期和临近羽化阶段意义较大,但这两个阶段蝇蛹的变化异常迅速,难以捕捉,后续的实验可重点集中在此,持续观察争取采集到有意义的时间信息。实际案例中,蛹壳颜色变化受到许多外界因素影响,而案发现场的温度对于蛹期的生长发育有着重要影响(Michaud *et al*., 2012)。因此,本实验设置了不同恒温的基础条件来为实际案例中应用标准色板提供可参考的依据。有关实际情况下环境光照、湿度等因素对蛹期发育的影响等问题有待进一步研究(杨帆等, 2015)。本实验表明蝇蛹的颜色变化可作为比较直观的判断依据。利用蛹壳颜色推断蛹期,不需要复杂的专业知识,操作技能和高端的仪器设备,简便实用,将待检蛹壳与本研究得到的标准色板进行目视比色,可粗略快速推测蝇蛹发育时间,为死后间隔时间的推断提供较科学的依据,具有一定实用价值。

## 参考文献 (References)


Fan ZD, 1997. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 6. Diptera: Calliphoridae. Science Press, Beijing. 96 – 100. [范滋德, 1997. 中国动物志, 昆虫纲, 第 6 卷. 双翅目: 丽蝇科. 北京: 科学出版社. 96 – 100]

Greenberg B, 1985. Forensic entomology: case studies. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 31: 25 – 28.

Greenberg B, 1995. Flies as forensic indicators. *J. Med. Entomol.*, 28 (5): 553 – 577.

Hall MJR, Simonsen TJ, Martín-Vega D, 2017. The 'dance' of life: visualizing metamorphosis during pupation in the blow fly *Calliphora vicina* by X-ray video imaging and micro-computed tomography. *R. Soc. Open Sci.*, 4(1): 160699.

Hu C, 2000. Forensic Entomology. Chongqing Press, Chongqing. 11 – 21. [胡萃, 2000. 法医昆虫学. 重庆: 重庆出版社. 11 – 21]

Li XB, Gong Q, Wan LH, Jiang D, Jiao YG, 2013. Auxiliary inference

of the postmortem interval with necrophagous flies. *Chin. J. Forensic Med.*, 28(3): 248 – 249.［李学博，巩强，万立华，江东，焦亚光，2013. 利用嗜尸性蝇类辅助推断死亡时间. 中国法医学杂志，28(3): 248 – 249］

Ma MY, Wang Y, Dong YY, Wang JF, 2016. Discussion on forensic entomology standards and guidelines for the on-site operation. *Forensic Sci. Technol.*, 41(2): 142 – 146.［马孟云，王禹，董玉友，王江峰，2016. 法医昆虫学检验现场操作标准探讨. 刑事技术，41(2): 142 – 146］

Ma T, Huang J, Wang JF, 2015. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation. *Forensic Sci. Int.*, 253(8): 88 – 93.

Michaud PJ, Schoenly KG, Moreau G, 2012. Sampling flies or sampling flaws: experimental design and inference strength in forensic entomology. *J. Med. Entomol.*, 49(1): 1 – 10.

Wang H, 2007. Pupal Morphogenesis of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in Different Constant Temperature and Its Significance in Forensic Medicine. MSc Thesis, Hebei Medical University, Shijiazhuang.［王贺，2007. 铜绿蝇蛹发育形态学用于死后间隔时间推断的研究. 石家庄：河北医科大学硕士学位论文］

Wang JF, Hu C, Chen YC, Min JX, Li JT, 2002. Using the pupal morphogenesis of *Aldrichina grahami* to estimate the postmortem interval. *Acta Entomol. Sin.*, 45(5): 696 – 699.［王江峰，胡萃，陈玉川，闵建雄，李俊涛，2002. 用巨尾阿丽蝇蛹期发育形态来推断死者死亡时间. 昆虫学报，45(5): 696 – 699］

Yang F, Li J, Qi LL, Wang H, Li ZM, 2015. The effect of morphine on the larvae of *Chrysomya megacephala* in nature. *J. Pathogen Biol.*, 10(11): 1012 – 1016.［杨帆，李嘉，齐莉莉，王贺，李泽民，2015. 自然条件下吗啡对大头金蝇幼虫生长发育情况的影响. 中国病原生物学杂志，10(11): 1012 – 1016］

Zheng N, Shi XZ, Zhu GH, Niu HB, Fan XM, Liu J, Chen XX, 2016. The forensic significance of characteristics of the protein degradation in puparium cases of *Chrysomya megacephala*. *Chin. J. Forensic Med.*, 31(4): 355 – 357.［郑娜，石学志，朱光辉，牛憨笨，范新民，刘杰，陈献雄，2016. 大头金蝇蛹壳蛋白质降解特征的法医学意义. 中国法医学杂志，31(4): 355 – 357］

（责任编辑：赵利辉）